

DETECÇÃO E TIPAGEM VIRAL PARA PAPILOMAVÍRUS HUMANOS : PROGRESSOS RECENTES E PERSPECTIVAS CLÍNICAS*

HUMAN PAPILLOMAVIRUS DETECTION AND TYPING: RECENT PROGRESS AND CLINICAL PERSPECTIVES

Cecília T Bigio¹, Fabiano A Barboza², Silvia MB Cavalcanti³

RESUMO

A biologia molecular e tecnologias relacionadas tiveram um avanço espetacular nos últimos anos, ao contrário da microscopia de rotina. A contribuição dos testes de DNA para HPV como triagem de mulheres com anormalidades de baixo grau ou diagnóstico impreciso em esfregaços de colo uterino parece ser valiosa, auxiliando na conduta clínica. O uso em larga escala dos testes para HPV necessita de estudos prospectivos em andamento utilizando grandes populações de pacientes de rotina clínica. É esperado que os resultados tragam dados para as expectativas em relação ao valor dos testes para HPV na triagem de precursores de câncer de colo uterino, sua contribuição na triagem diagnóstica de pacientes com laudos de citologia inconclusivos e para o controle de qualidade da excelência em citopatologia.

Palavras-chave: Papilomavírus humanos, neoplasia, câncer, biologia molecular

ABSTRACT

The molecular biology and related technologies had made impressive advances in the last decades, differently from routine optical microscopy. The contribution of those recent DNA tests to the detection of HPV in screening female low grade lesions and inconclusive diagnosis in cervical smears are valious, improving clinical management. The large scale use of HPV test still needs prospective studies evaluating greater populations of clinical routine. It is worth to expect that the new data will clarify the usefulness of HPV detection in screening cancer precursors, contributing in diagnostic screening of patients at higher risk for cancer and to help in improve citopathology as a quality control.

Keywords: Human papillomavirus, neoplasia, cancer, molecular biology

ISSN: 0103-4065

DST – J bras Doenças Sex Transm 14(4): 32-35, 2002

INTRODUÇÃO

Avanços da biologia molecular, nas últimas décadas, aumentaram indubitavelmente nossa compreensão da relação entre o Papilomavírus Humano (HPV) e a neoplasia cervical. No começo dos anos oitenta, a biologia molecular trouxe informações principalmente sobre a interação vírus-célula e sua relação com a carcinogênese. Posteriormente, foram identificadas alterações morfológicas induzidas pelo vírus e, mais recentemente, passamos a utilizar potentes testes de detecção viral para diagnosticar alterações compatíveis com HPV, o que tem sido o centro das atenções científicas.

Em estudos utilizando técnicas de mensuração viral foi confirmado que determinados tipos de HPV são a causa central de desenvolvimento do câncer cervical e seus precursores. Além disso, tecnologias desenvolvidas nessa área promoveram avanços na nossa compreensão do processo preciso de detecção e tipagem do HPV bem como na investigação e diagnóstico de lesões relacionadas com o vírus (para revisão – Ferenczy, 1995)¹. Este artigo faz uma revisão sobre os

testes de HPV desenvolvidos, seus protocolos de investigação e diagnóstico, assim como dos controles de qualidade dos estudos patológicos e citológicos do vírus.

MÉTODOS DE INVESTIGAÇÃO DO DNA DO HPV

Há várias técnicas disponíveis para demonstrar a presença do DNA dos HPVs. O teste de hibridização por *Southern Blot* vem sendo usado em vários experimentos laboratoriais e é, ainda, o padrão ouro para detecção do DNA do HPV. Este teste tem alta sensibilidade e pode detectar uma única cópia viral por célula. Além disso, este teste distingue os diferentes tipos de HPV. Por ser complexa, consumir muito tempo e necessitar de tecidos a fresco, essa técnica é imprópria para uso clínico. A hibridização por *Dot Blot* é a simplificação do Método de *Southern Blot*. O *Dot Blot* é fácil de usar, de baixo custo e possui sensibilidade similar à do *Southern Blot* (Schiffman, 1991)². O *Food and Drug Administration* - FDA dos Estados Unidos aprovou o uso clínico dos testes de *Dot Blot*, de nome comercial *Virapapã* e *Viratypeã* (*Digene Diagnostics Inc., Silver Spring, MD*). Amostras para detecção do DNA dos Papilomavírus têm sido coletadas com auxílio de escova cervical e um tubo coletor para o transporte. O teste *Virapapã* usa um limite de 3 pg/ml de amostra.

1 Bolsista de Iniciação científica – Projeto PIBIC- UFF/CNPq

2 Bolsista de Iniciação científica – Projeto PIBIC- UFF/CNPq

3 Professora Adjunta da Disciplina de Virologia – MIP/CMB/CCM-UFF

*Trabalho financiado pelo CNPq e pela FAPERJ

Utiliza-se de um coquetel radioativo de RNA do vírus dos tipos 6, 11, 18, 31, 33 e 35. O *Viratype* distingue tipos de baixo risco (6 e 11) daqueles de alto risco (16 e 18) e de risco intermediário (31,33,35). Para se aumentar a sensibilidade de detecção do DNA do HPV, este tem sido aprimorado com a adição de 7 novos tipos de HPV, que foram mais recentemente descritos. São eles: 42, 43, 44 (baixo risco), 51, 52, 45 e 56 (risco intermediário/alto). Esses 14 tipos são os mais encontrados nos cânceres e pré-cânceres de colo e de outras regiões do trato genital baixo. Recentemente desenvolvido pela *Digene Diagnostics Inc.*, está a tão falada captura híbrida de DNA viral. Esse teste possui 18 tipos de HPV associados em dois grupos: baixo e alto risco. A Captura Híbrida utiliza a técnica de hibridização sanduíche, na qual um híbrido, formado por DNA de HPV da lesão com RNA complementar do mesmo é capturado por um anticorpo anti-híbrido e o complexo é colocado em reação com fosfatase alcalina e substrato quimioluminescente. A luz emitida sofre uma leitura em espectrofotômetro, dando uma medida precisa. O teste detecta presença ou ausência de DNA do papilomavírus, quando tipos virais de baixo ou alto risco oncogênico estão presentes, e fornece medidas quantitativas dos tipos presentes, embora sua significância clínica não esteja ainda determinada. A sensibilidade da Captura Híbrida é semelhante à da Hibridização com *Southern Blot* (Ferency, 1995)¹.

Outros métodos de detecção do DNA de HPV utilizam a tecnologia de Hibridização *in situ* (Enzo) com amostras não radioativas de HPV (6, 11, 16, 18, 31, 33, 35) em tecidos histológicos embebidos em parafina. A técnica permite uma avaliação da relação entre o HPV e a morfologia dos espécimes histológicos. Como a sensibilidade da Hibridização *in situ* é de 20 a 50 vírus por célula, resultados positivos têm valor clínico (Lorincz, 1989)³.

A mais sensível técnica de detecção de HPV é, sem dúvida, a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR com Primer L1). Esse método é baseado na amplificação enzimática *in vitro* do DNA do HPV. Neste, o primer de consenso, L1, é usado para a detecção de um gene do vírus. A princípio, a quantidade de cópias mínima detectada do vírus é de uma unidade, mas, na prática, esse valor sobe para cerca de 100 vírus. O PCR é relativamente fácil de usar, os resultados possuem leitura mecânica, não subjetiva, o que permite diferenciação de tipos. Sua alta sensibilidade é potencialmente uma desvantagem, uma vez que a contaminação cruzada entre amostras pode ocorrer, representando um alto índice de resultados falsos positivos. No entanto, a importância clínica da detecção de baixa quantidade de vírus na amostra ainda não está muito clara. Hoje, o PCR não é ainda uma tecnologia molecular padronizada, ainda não está sendo aprovada para detecção clínica de DNA do Papilomavírus pelo FDA, mas é uma grande ferramenta diagnóstica (Schiffman, 1992)⁴.

Desconsiderando o teste utilizado, a presença do HPV é influenciada por vários fatores, incluindo idade, fase do ciclo menstrual, hormônios exógenos e imunocompetência. Altos índices de detecção foram observados em mulheres jovens, grávidas e/ou imunossuprimidas. Em todas essas situações, a replicação viral está altamente ligada a cargas virais elevadas, levando a uma grande probabilidade de detecção do DNA viral.

REGRAS CLÍNICAS PARA TIPAGEM DO HPV

A importância clínica do teste viral pode ser observada em três aspectos:

- investigação de mulheres com alto risco de terem lesões pré-malignas;
- investigação de mulheres com alterações de baixo grau em seus esfregaços citológicos que têm tipos de HPV de alto risco;
- promoção de controle de qualidade de diagnósticos histológicos e citológicos.

INVESTIGAÇÃO UTILIZANDO TESTES DE DETECÇÃO DE HPV

A investigação de uma doença requer que o teste ou testes empregados possuam alta sensibilidade e especificidade de detectá-la. Sensibilidade se refere ao número de pacientes com a doença que têm resultado positivo no teste em questão enquanto que especificidade mede a proporção de pacientes com resultados positivos que possuem mesmo a doença em questão. A citologia de colo uterino, por tanto tempo utilizada como teste de triagem para detectar doença cervical, demonstrou altos índices de resultados falso-negativos (baixa sensibilidade), assim como falso-positivos (baixa especificidade), com índices de 20% e maiores de 15%, respectivamente. A utilização dos testes de detecção do DNA do HPV poderia reduzir os índices de falso-positivos e falso-negativos dos testes e citologia, o que é um forte apelo já que tem sido vistas altas taxas de carcinoma invasivo em mulheres jovens. Para reduzir os numerosos falso-negativos e falso-positivos, pesquisadores sugerem uma rotina combinada de citologia com testes de detecção de DNA viral (Reid e Lorincz, 1991)⁵.

Em um estudo, Sherman *et al* (1994)⁶ observaram que testes de detecção viral aumentou o número de pacientes doentes de 68% (utilizando somente a citologia) para 89% (utilizando os dois exames). No entanto, esse estudo inclui mulheres com uma história de esfregaços anormais e não somente a população de mulheres sob triagem de rotina. Teoricamente, pacientes com lesões cervicais, mas com esfregaço cervical negativo, devem fazer o teste de detecção de DNA viral e vice-versa. Resultados de estudos recentes mostraram vários problemas nessas futuras combinações. O maior fator limitante foi a dificuldade em aconselhar as mulheres com infecção latente pelo vírus. Estão essas mulheres em risco de desenvolver uma neoplasia intra-epitelial cervical. Se estão, deveriam fazer colposcopia ou serem acompanhadas por esfregaços cervicais em intervalos inferiores aos normalmente recomendados (Cox *et al*, 1992)⁷.

Mais recentemente, o valor diagnóstico de testes virais para detectar precursores de alto grau de câncer cervical foi demonstrado em ensaios clínicos utilizando o novo kit de captura híbrida. Esses estudos incluem mais de 800 mulheres com colposcopia prévia sugestiva de células escamosas atípicas com significado indeterminado (ASCUS) ou Lesões escamosas intraepiteliais de baixo grau (LSIL). A sensibilidade do teste viral misto, utilizando as 18 sondas ou somente 9 (de risco oncogênico intermediário/alto), para detectar NIC de alto grau, atingiu máximo de 70 a 85%. Quando o teste de detecção de DNA viral foi usado em conjunto com a

citologia, os níveis de detecção de NIC foram de 93 a 100%. Estes estudos, assim como os mencionados anteriormente, foram realizados em populações já sabidamente positivas e, portanto, não se pode extrapolá-los para populações sob triagem de rotina (Cox et al, 1992; Wright et al, 1995)⁸.

O custo – benefício dos testes de detecção do DNA viral pode talvez melhorar com o aumento de sua especificidade. Isso pode ser feito limitando o uso para mulheres com idade maior que 35 anos ou com alta persistência ou, ainda, positivas para vírus de alto potencial oncogênico bem como com lesões de alto grau e, finalmente, pacientes com alto risco de desenvolver lesões de alto grau, como pacientes HIV-positivo. Nessas situações, um simples teste positivo é considerado com maior significância clínica do que nas adolescentes e menores de 20 anos, porque isso sugere fortemente a presença de doença persistente ou infecção latente por HPV (Schiffman, 1992)⁴.

A prevalência de infecção latente por HPV em mulheres acima de trinta anos é inferior a 10% e menos da metade destas estão associadas com vírus de alto risco oncogênico, como os tipos 16, 18, 45 ou 56. Observando a problemática do controle citológico negativo, pacientes com teste de DNA positivos ou mulheres com infecção persistente e alteração de baixo grau possuem um baixo risco de desenvolver lesões significantes, enquanto que aquelas com altos níveis de DNA do vírus talvez possuam alto risco de desenvolver NIC (Cox et al, 1995)⁹. Koutsky et al. (1992)¹⁰, em seu estudo de corte de 241 mulheres, encontrou uma incidência cumulativa de CIN de alto grau em dois anos, estando 28% entre aquelas com persistência de testes de DNA positivos versus 3% entre aquelas com teste de DNA negativo. Outros estudos indicaram um risco elevado a NIC de alto grau, detectável à citologia relacionado àqueles resultados positivos no teste de DNA que perduram por 2 a 8 anos (Cavalcanti et al, 2000)¹¹.

Isto mostra que mulheres com citologia negativa com altos níveis de HPV de alto risco oncogênico talvez se beneficiem com um exame colposcópico, e, se a doença não for encontrada, talvez devam ser acompanhadas por 5 anos, de 6 em 6 meses, para a procura de NIC em estágios iniciais. Curiosamente, o risco de NIC retorna para níveis controlados depois de 5 anos de positividade. Essas mulheres podem, então, retornar aos seus exames de rotina. Quantificar o DNA do HPV na amostra talvez seja importante para se avaliar se lesões sub-clínicas estão aptas a produzir mais cópias virais do que infecções latentes, e testes virais que quantificam o DNA, como o PCR, podem ser úteis para diferenciar processos infecciosos. Como um todo, a epidemiologia e os dados moleculares suportam os valores preditivos da quantificação dos testes de DNA em pacientes com citologia negativa com infecções latentes persistentes com altos níveis de DNA viral (Koutsky et al, 1992)¹⁰.

TRIAGEM DIAGNÓSTICA PARA HPV

Um dos maiores debates em patologia do colo uterino hoje está concentrado na conduta clínica de pacientes com resultados incertos, inconclusivos e baixo grau de neoplasia (LSIL) em esfregaços corados pela técnica de Papanicolaou. Uma corrente recomenda colposcopia para todas as pacientes com diagnóstico citológico de atipia com base nos

seguintes critérios: 1- Uma parcela significativa (7-20%) das pacientes com ASCUS/LSIL apresentam na histopatologia lesões NIC de alto grau e 2- terapia para lesões intraepiteliais estão amplamente difundidas e tem grande eficácia. A outra corrente recomenda o acompanhamento ao invés de colposcopia e tratamento das pacientes com diagnóstico citológico de neoplasia de baixo grau. Segundo essa corrente mais de 60% das lesões de baixo grau na citologia regredem espontaneamente, não são lesões teciduais iniciais, mas na realidade representam falsos-positivos da citologia de condições benignas ou variações normais do epitélio, por exemplo, metaplasias escamosas.

O sistema de Bethesda¹² foi criado para eliminar a confusão no diagnóstico, reduzir erros da citologia e exames excessivos e desnecessários, pois traz um sistema de terminologia da citologia padronizado e simplificado. As duas principais categorias nesse esquema de classificação são ASCUS e LSIL. A primeira substitui a classe II de Papanicolaou e a segunda classe III de Papanicolaou (displasia leve, CIN I, atipia colicitótica com ou sem displasia, atipia condilomatosa e efeito HPV). Infelizmente, classificações não necessariamente melhoram a excelência do diagnóstico, e não houve redução de falso-positivos com a introdução da nova terminologia.

Para remediar esta situação, foram propostas duas opções para apurar de forma mais acurada o que realmente é patológico. Uma opção é treinar mais colposcopistas com alto grau de excelência. Porém, excelência em colposcopia só se adquire após longo treinamento, e a interpretação da colposcopia é baseada em critérios subjetivos. A precisão diagnóstica e a capacidade de reprodução de lesões de baixo grau é de regular a pobre. Uma segunda estratégia seria o uso de um teste baseado em medidas objetivas para que mulheres com esfregaços ASCUS/LSIL fossem identificadas como de alto risco para a presença ou o desenvolvimento de NIC de alto grau. Somente essas pacientes seriam submetidas à colposcopia, enquanto que as outras seriam acompanhadas com exames citológicos repetidos (Ferenczy, 1995)¹.

Métodos potencialmente interessantes seriam os testes para HPV como os ensaios de DNA sistema HPV ProfileTM (dot blot), a hibridização in situ e a captura híbrida. Os estudos que usaram esta tecnologia mostram um alto grau de sensibilidade quando associada à citologia. Estudos recentes com pacientes com esfregaços corados pelo Papanicolaou apresentando discretas anormalidades, a combinação da citologia com teste de DNA para HPV (usando qualquer dos testes de hibridização) teve uma sensibilidade de 93/100% para detectar NICs de alto grau (Terry et al, 2000). Finalmente, o teste utilizando sondas de vírus com alto e médio potencial oncogênico identificaria pacientes com LSIL que estão sob risco de evoluírem para alto grau CIN. Em estudo prospectivo 29% das pacientes com lesões morfológicas de baixo grau mas com vírus de alto potencial oncogênico 16/18 evoluíram para NIC III/Ca (Cavalcanti et al., 2000)¹¹.

Testes de biologia molecular para HPV tornam as decisões na conduta clínica (colposcopia x acompanhamento) mais fáceis, baseando-as em critérios objetivos, ao invés de critérios morfológicos e de colposcopia arbitrários. Segundo esse protocolo de triagem intermediária, somente mulheres com esfregaços com diagnóstico de ASCUS/LSIL e teste

positivo para HPV com alto potencial oncogênico seriam indicadas à colposcopia. As pacientes cujo teste de HPV fosse negativo, e apresentassem aspecto normal da cérvix não teriam indicação para colposcopia (Cox *et al*, 1992)⁷.

CONTROLE DE QUALIDADE COM O TESTE VIRAL

Estudos de correlação viral demonstraram quanto maior for a alteração morfológica na citologia ou na histologia, maior é o grau de positividade para HPV. Em um estudo recente utilizando cinco patologistas e *Southern blot* e PCR para detectar DNA de HPV, foi observado 100% de correlação entre o diagnóstico definido de lesão *intra-epitelial* escamosa (SIL) confirmado pela equipe, e detecção de DNA de HPV. Do mesmo modo, ausência de atipia significativa foi associada com baixa frequência de DNA de HPV, e a medida que a frequência fosse aumentando, crescia paralelamente a probabilidade de SIL. Portanto o teste de detecção viral contribui para: 1- permitir ao patologista avaliar sua precisão diagnóstica. 2- ensinar residentes a reconhecer critérios de alterações morfológicas relacionadas ao HPV. 3- controle do diagnóstico do laboratório de citologia. Vale saber que em vários estudos, 10-20 % de resultados positivos para HPV, mas negativos na citologia foram reclassificados como positivos em revisões (Kurman *et al*, 1994)¹⁴.

CONCLUSÃO

A biologia molecular e tecnologias relacionadas tiveram um avanço espetacular nos últimos anos, ao contrário da microscopia de rotina. A contribuição dos testes de DNA para HPV como triagem de mulheres com anormalidades de baixo grau ou diagnóstico impreciso em esfregaços de colo uterino parece ser valiosa, auxiliando na conduta clínica.

O uso em larga escala dos testes para HPV necessita de resultados de estudos prospectivos em andamento utilizando grandes populações de pacientes de rotina clínica. É esperado que os resultados tragam dados para as expectativas em relação ao valor dos testes para HPV na triagem de precursores de câncer de colo uterino, sua contribuição na triagem diagnóstica de pacientes com laudos de citologia inconclusivos e para o controle de qualidade da excelência em citopatologia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. FERENCZY A. Viral testing for genital human papillomavirus infections. *Int J Gynecol Cancer* (5): 321-328. 1995.
2. SCHIFFMAN MH, BAUER HM, LORINCZ AT, *et al*. Comparison of *Southern Blot* hybridization and polymerase chain reaction methods for detection of human papillomavirus DNA. *J Clin Microbiol* (29): 573-577. 1991.
3. LORINCZ AT. Detection of human papillomavirus testing. *Diag Clin Test* (27): 28-37. 1989.
4. SCHIFFMAN MH. Validation of hybridization assays: correlation of filter in situ, *Dot Blot* and PCR with *Southern blot*. In: Munoz N, Bosch FX, Shah KV, *et al.*, eds. *The Epidemiology of Human Papillomavirus and Cervical Cancer*, IARC Scientific Publication No 119. Oxford: Oxford University Press, 169-179. 1992.
5. REID R, LORINCZ AT. Should family physicians test for human papillomavirus infection? An affirmative view. *J Fam Pract* (32): 183-188. 1991.
6. SHERMAN ME, SCHIFFMAN MH, LORINCZ AT, *et al*. Toward objective quality assurance in cervical cytopathology: correlation of cytopathologic diagnosis with detection of high risk HPV types. *Am J Clin Pathol* (102):182-187. 1994.
7. COX JT, SCHIFFMAN MH, WINZELBERG AJ, PATTERSON JM. An evaluation of human papillomavirus testing as part of referral to colposcopy clinic. *Obstet Gynecol* (80): 389-395. 1992.
8. WRIGHT TC JR, SUN XW, KOULOS J. Comparison of management algorithms for the evaluation of women with lowgrade cytologic abnormalities. *Obstet Gynecol* (85): 202-210. 1995.
9. COX JT, LORINCZ AT, SCHIFFMAN MH, SHERMAN ME, CULLEN A, KURMAN RJ. HPV testing by hybrid capture is useful in triaging women with a cytologic diagnosis of ASCUS. *Am J Obstet Gynecol* (85): 312-321. 1995.
10. KOUTSKY LA, GALLOWAY DA, HOLMES KK. Epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Epidemiol rev* (10): 122-163. 1992.
11. CAVALCANTI, SMB; ZARDO LG; PASSOS MRL; OLIVEIRA LHS. Epidemiological aspects of Human papillomavirus infection and cervical cancer in Brazil. *J Infection* 2000 (40): 80-87.
12. National Cancer Institute National Cancer Institute Workshop. The 1988 Bethesda System for reporting cervical/vaginal cytologic diagnostic. *JAMA* (262): 931-934. 1989.
13. TERRY G; HO L; CUSICK J; LOHNAS IM; LORINCZ A. Detection of High-Risk HPV types by the hybrid Capture 2 test. *J Med Virol* (65): 155-162. 2001
14. KURMAN 1994 KURMAN RJ. Integrim guidelines for management of abnormal cervical cytology. *JAMA* (271): 1866-1869. 1994

Endereço para correspondência:

SILVIA MB CAVALCANTI

Departamento de Microbiologia e Parasitologia/CMB/CCM-UFF
Rua Prof. Ernani Pires de Mello, 101, Centro,

Niterói - 24210-030, RJ, Brasil

E-mail: silviabc@ism.com.br

DST5

V CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE DOENÇAS SEXUALMENTE TRANSMISSÍVEIS

A GENTE SE VÊ NO RECIFE EM 2004

29 de agosto a 01 de setembro